

ESTADO DEL ARTE DE LA QUINUA EN EL MUNDO EN 2013



Food and Agriculture
Organization of the
United Nations

Secretaría del Año Internacional de la Quinua: Salomón Salcedo (FAO)
Coordinación General del Año Internacional de la Quinua: Tania Santivañez (FAO)
Coordinación científica y técnica: Didier Bazile (CIRAD)
Edición científica: Didier Bazile, Daniel Bertero y Carlos Nieto
Revisión de textos y estilo: Raúl Miranda
Diseño: Marcia Miranda
Colaboradores: Sara Granados y Gonzalo Tejada

Para citar el libro completo:

BAZILE D. et al. (Editores), 2014. "Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013": FAO (Santiago de Chile) y CIRAD, (Montpellier, Francia), 724 páginas

Para citar solo un capítulo:

AUTORES, (2014). Título del capítulo. Capítulo Numero XX. IN: BAZILE D. et al. (Editores), "Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013": FAO (Santiago de Chile) y CIRAD, (Montpellier, Francia): pp. XX-YY

Las denominaciones empleadas en este producto informativo y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, por parte de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), juicio alguno sobre la condición jurídica o nivel de desarrollo de países, territorios, ciudades o zonas, o de sus autoridades, ni respecto de la delimitación de sus fronteras o límites. La mención de empresas o productos de fabricantes en particular, estén o no patentados, no implica que la FAO los apruebe o recomiende de preferencia a otros de naturaleza similar que no se mencionan.

Las opiniones expresadas en este producto informativo son las de su(s) autor(es), y no reflejan necesariamente los puntos de vista o políticas de la FAO.
ISBN 978-92-5-308558-3 (PDF)

© FAO, 2014

La FAO fomenta el uso, la reproducción y la difusión del material contenido en este producto informativo. Salvo que se indique lo contrario, se podrá copiar, descargar e imprimir el material con fines de estudio privado, investigación y docencia, o para su uso en productos o servicios no comerciales, siempre que se reconozca de forma adecuada a la FAO como la fuente y titular de los derechos de autor y que ello no implique en modo alguno que la FAO apruebe los puntos de vista, productos o servicios de los usuarios. Todas las solicitudes relativas a la traducción y los derechos de adaptación así como a la reventa y otros derechos de uso comercial deberán dirigirse a www.fao.org/contact-us/licence-request o a copyright@fao.org.

Los productos de información de la FAO están disponibles en el sitio web de la Organización (www.fao.org/publications) y pueden adquirirse mediante solicitud por correo electrónico a publications-sales@fao.org.

CAPÍTULO 2.3.

TÍTULO: TOLERANCIA A CONDICIONES SALINAS

*Autor para correspondencia: Stefania BIONDI <stefania.biondi@unibo.it>

STEFANIA BIONDI ^a, KARINA B RUIZ ^b, ENRIQUE A MARTÍNEZ ^{c,d}, ANDRÉS ZURITA-SILVA ^e, FRANCESCO ORSINI ^g, FABIANA ANTOGNONI ^h, GIOVANNI DINELLI ^f, ILARIA MAROTTI ^g, GIORGIO GIANQUINTO ^g, SARA MALDONADO ^h, HERNÁN BURRIEZA ^h, DIDIER BAZILE ⁱ, VERENA ISABELLE ADOLF ^j, SVEN-ERIK JACOBSEN ^j

^a Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali, Università di Bologna, via Irnerio 42, 40126 Bologna, Italia

^b Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad de Chile. Av. Santa Rosa 11315, 8820808 La Pintana, Casilla 1004, Santiago, Chile

^c Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA), Colina El Pino s/n, La Serena, Chile

^d Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Larrondo 1281, Coquimbo, Chile

^e Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro de Investigación Intihuasi, Colina San Joaquín s/n, Casilla 36-B, La Serena, Chile

^f Dipartimento di Scienze Agrarie, Università di Bologna, viale Fanin 44, 40127 Bologna, Italia

^g Dipartimento di Scienze della Qualità della Vita, Università di Bologna, Corso D'Augusto 237, 47921 Rimini, Italia

^h Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Pabellón 2, Ciudad Universitaria, C1428EGA Ciudad de Buenos Aires, Argentina

ⁱ UPR-GREEN, CIRAD-ES; TA C-47/F, Campus International de Baillarguet 34398 Montpellier Cedex 5, Francia

^j Facultad de Ciencias de la Universidad de Copenhague, Højbakkegaard Allé 13, DK-2630 Taastrup, Dinamarca

Resumen:

La salinidad está hoy entre las restricciones más extendidas en la agricultura de regadío. Así, la tolerancia a la sal es un rasgo agronómicamente importante que está recibiendo cada vez más atención entre los científicos de todo el mundo. La quinua es tolerante a la salinidad del suelo y otros factores ambientales adversos, y por consiguiente atrae la atención de los investigadores como un cultivo posible en un escenario mundial cambiante en el que la escasez de los recursos hídricos y el aumento de la salinización del suelo y el agua son las principales causas de la pérdida de cultivos. La

tolerancia excepcional de la quinua a la salinidad, heladas, sequías y otros tipos de estrés abiótico también hace que sea una especie modelo para la investigación de los mecanismos celulares, fisiológicos, biomoleculares y morfológicos en la base de la tolerancia al estrés en halófitas y en las plantas en su conjunto. Hay ecotipos de quinua adaptadas al valle, altiplano, salares, el nivel del mar y los trópicos, que muestran una amplia variabilidad genética de la tolerancia a la salinidad. Por esta razón, la quinua representa un recurso valioso para la selección del material más adecuado para la obtención de nuevas variedades adaptadas a diferentes condiciones ambientales

y geográficas. En este capítulo, se describen los estudios científicos sobre la tolerancia a la salinidad en la quinua realizados en la última década por numerosos grupos de investigación que operan en al menos nueve países diferentes. Nos centramos en los estudios en los que se comparan diferentes genotipos de quinua por su respuesta a condiciones de salinidad, lo que demuestra que la tolerancia a la sal es un rasgo complejo y multigénico que implica una gran cantidad de adaptaciones fisiológicas y estructurales. Se reportan los resultados disponibles hasta ahora sobre el efecto de la salinidad sobre las propiedades nutricionales de la quinua.

1. Introducción.

La quinua pertenece a las quenopodiáceas (familia Amaranthaceae), un grupo de plantas que comprende el mayor número de géneros halófitos (es decir, “amantes de la sal”). La quinua es considerada como una halófita facultativa y algunas variedades son capaces de hacer frente a niveles tan altos de salinidad como los presentes en el agua de mar, es decir, la conductividad eléctrica (CE) de *ca.* 50 dS/m (correspondiente a aproximadamente 600 mM de NaCl). Por lo tanto no es sorprendente que la quinua crezca en suelos salinos, desde los salares del altiplano boliviano a las zonas costeras de Chile. La naturaleza halófita de la quinua ha sido confirmada también en condiciones experimentales (en maceta e hidropónico). En un experimento de invernadero, Hariadi *et al.* (2011) probaron seis niveles de salinidad durante 70 días en el cultivar (cv.) Titicaca y observaron un efecto inhibitorio significativo sobre la germinación de las semillas sólo para concentraciones superiores a 400 mM de NaCl, mientras que el crecimiento óptimo de las plantas se obtuvo entre 100 y 200 mM de NaCl. Esto está de acuerdo con resultados previos que muestran que el rendimiento de la quinua es más alto bajo condiciones moderadamente salinas (10-20 dS m⁻¹) (Jacobsen *et al.* 2003).

La quinua también es tolerante a otros tipos de factores ambientales adversos (colectivamente conocidos como “estrés abiótico”), tales como las heladas (Jacobsen *et al.* 2005, 2007; Rosa *et al.* 2009), y la sequía (Bosque-Sánchez *et al.* 2003; García *et al.* 2003, Geerts *et al.* 2006, Pulvento *et al.* 2010; Jacobsen *et al.* 2009, 2012, Fuentes y Bhargava 2011; Razzaghi *et al.* (2012a, b). Por esta razón, está atrayendo la atención de investigadores

de todo el mundo como posible cultivo alternativo frente a la disminución de los recursos de agua dulce y el aumento de la salinización del suelo, y como especie modelo para desentrañar los mecanismos en la base de la tolerancia al estrés en las plantas. Hoy en día, la investigación sobre la quinua está avanzando más allá de la tolerancia a la sal y la sequía, e incluye estudios sobre los efectos de otros factores inductores de estrés abiótico (por ejemplo, metales pesados, altas y bajas temperaturas, radiaciones UV/FR) y biótico (patógenos).

2. Diferencias genotípicas.

El cultivo de la quinua es una herencia familiar y los agricultores andinos han demostrado ser un instrumento valioso en la preservación de la diversidad genética de la quinua en sus campos (Fuentes *et al.* 2012). Esta biodiversidad ha sido evaluado por métodos moleculares (Christensen *et al.* 2007; Fuentes *et al.* 2009), y las semillas de numerosas accesiones de la quinua están siendo conservadas en los bancos de genes de todo el mundo (véase el capítulo 1.5. “Estado de los recursos genéticos” en este libro).

La existencia de cinco categorías (ecotipos) de quinua, adaptadas a diferentes condiciones, sugiere que las especies deben exhibir una amplia variabilidad genética en la tolerancia a las condiciones climáticas adversas. Un enfoque hacia la evaluación y la comprensión de la tolerancia a la salinidad de la quinua ha sido, entonces, comparar los diferentes genotipos en cuanto a la germinación de semillas, crecimiento y rendimiento en condiciones salinas e investigar los mecanismos morfológicos y fisiológicos responsables de estas diferencias genotípicas.

Muchas de las casi 2,500 accesiones de quinua disponibles hasta la fecha han demostrado que difieren en su respuesta a la salinidad durante la germinación de semillas y más tarde, durante el ciclo de crecimiento. Jacobsen *et al.* (2003) observaron que las semillas de la variedad peruana Kancolla pudieron germinar en condiciones de salinidad cercanas a las del agua de mar (es decir, hasta 57 dS m⁻¹). En una comparación entre los cultivares de Bolivia Robura y Sajama, se encontró que el primero era más sensible a la salinidad durante la germinación con un límite de tolerancia de NaCl 100 mM (Schabes y Sigstad 2005). De las 182

accesiones peruanas probadas por Gómez-Pando *et al.* (2010) sólo los 15 más tolerantes mostraron un alto porcentaje de germinación (60%) a un nivel de salinidad de 25 dS/m.

Ruiz-Carrasco *et al.* (2011) probaron la germinación *in vitro*, el crecimiento, y las respuestas fisiológicas a corto plazo a la sal de los cuatro genotipos costeros chilenos procedentes de un gradiente latitudinal que va desde el centro hasta el sur de Chile (PRJ, PRP, UdeC9, BO78). El objetivo fue vincular estas modificaciones a los niveles de expresión de dos genes transportadores de sodio clonados en la quinua, *Salt Overly Sensitive1 (Cq SOS1)* y *CqNHX* (véase el párrafo 3.3). Encontraron una reducción significativa en la tasa de germinación sólo en el nivel más alto de salinidad (300 mM NaCl) y en el genotipo del extremo sur (BO78), donde también se inhibió la longitud de la raíz. La relación de peso fresco de raíz/tallo fue afectada de manera diferenciada por la sal, con los valores más bajos en BO78. La prolina y las poliaminas, que se sabe están asociadas con la respuesta al estrés salino (véase el apartado 3.2.3), así como los niveles de transcripción de los dos genes también fueron modificados de manera genotipo-específica tras exposición a 300 mM NaCl. Los resultados globales indican que, de las cuatro accesiones evaluadas, BO78, procedente de un área con condiciones relativamente menos severas en términos de precipitaciones, era la menos tolerante a la sal, lo que sugiere una relación entre la tolerancia a la salinidad y la sequía.

Delatorre-Herrera y Pinto (2009) probaron otros cuatro genotipos chilenos diferentes y encontraron que con 200 mM NaCl la selección más afectada fue Hueque (con una disminución del 50% en la capacidad de germinación), mientras que la disminución en el cv. Amarilla fue sólo del 6%. A 400 mM NaCl la tasa de germinación fue menor para todos los genotipos, en particular los de las zonas no salinas, que germinaron después de 22 h en comparación con 10 h para los que provienen de una zona salina, lo que sugiere que la salinidad no sólo reduce el porcentaje de germinación, sino que también retrasa el proceso. Por otra parte, la contribución relativa del efecto osmótico (es decir, la sequía generada por la alta salinidad del suelo) y de la toxicidad de iones (debido a la acumulación excesiva de Na⁺ y Cl⁻ en los tejidos vegetales)

también fue analizada, y se indica que la salinidad tuvo un efecto diferente sobre la germinación en diferentes genotipos de quinua (Delatorre-Herrera y Pinto, 2009). Esto puede explicar por qué los datos con respecto a la contribución de estos efectos sobre la germinación de quinua son contradictorios. Al mismo tiempo, esta contribución diferencial genotipo-específica de los dos factores puede proporcionar una base para producir variedades mejoradas adaptadas a condiciones de campo particulares. Por lo tanto, la alta osmotolerancia durante la germinación puede ser una ventaja en suelos afectados por sequía y suelos ligeramente salinos, mientras que la tolerancia a la toxicidad de iones sería ventajosa en condiciones de alta salinidad.

Gómez-Pando *et al.* (2010) también estudiaron las 15 accesiones peruanas más tolerantes a la sal en la etapa de madurez y encontraron que algunos genotipos mostraron una reducción en altura en condiciones salinas, mientras que otros no lo hicieron o incluso mostraron un aumento. Lo mismo se observó para el peso seco de la hoja y raíz y el rendimiento. En particular, los resultados indicaron una gran influencia del genotipo de la quinua en masa seca de raíz por planta en condiciones salinas. Si bien en una accesión se observó una reducción del 80% en masa seca de la raíz respecto a los controles, lo que refleja su baja tolerancia a la sal, otra accesión superó el control en esta característica, lo que refleja alta tolerancia a la sal. En general, una baja altura de la planta, corta duración del ciclo de vida, y el máximo rendimiento de semilla e índice de cosecha se consideran rasgos agrícolas deseables.

En un experimento en macetas comparando 14 variedades de quinua con respecto a la producción de biomasa, Adolf *et al.* (2012) reportaron que dos variedades pertenecientes al tipo real (Pandela rosada y Utusaya), adaptados a las condiciones climáticas extremadamente duras del sur del altiplano boliviano y un cultivar de los Andes del sur de Perú (Amarilla de Marangani) fueron las variedades menos afectadas con respecto a la producción de biomasa relativa y altura en la madurez en comparación con las otras variedades (Figura 1)

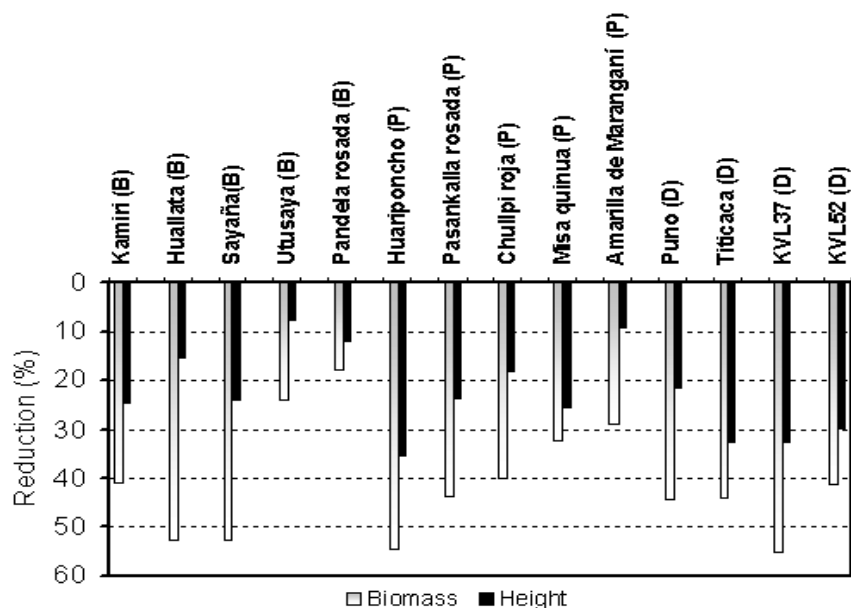


Figura 1: Nombre, origen (B = Bolivia, P = Perú, D = Dinamarca), y reducción en biomasa y altura de varios genotipos de quinua bajo condiciones salinas relativas a condiciones no salinas. Adaptado de Adolf *et al.* (2012).

En un estudio comparativo entre la quinua y la halófito “modelo” *Thellungiella halophila*, Morales *et al.* (2011) utilizaron dos genotipos del ecotipo de salar (Chipaya y Ollague) y dos genotipos del ecotipo de valle (CICA-17 de Perú y KU-2 de Chile). Los resultados indicaron una mayor reducción de peso fresco en condiciones salinas en *T. halophila* que en la quinua. De hecho, en 300 mM NaCl, *T. halophila* tuvo un promedio de disminución en peso fresco de 10 veces, pero Chipaya y Ollague de sólo 2 veces en comparación con sus respectivos controles. Bajo una fuerte salinidad (450 mM NaCl), los genotipos de quinua pertenecientes al ecotipo de salar mantuvieron una tasa de transpiración relativamente más alta que el ecotipo de valle, CICA-17 (ca. 50% y 40%, respectivamente, de los niveles de control). No se observaron diferencias notables entre los cultivares de quinua en términos de acumulación de iones y solutos compatibles, ni en los niveles de transcripción de varios genes en la hoja con un posible papel en la tolerancia a la sal, sin embargo, los perfiles de expresión génica en las raíces muestran algunas diferencias significativas entre los ecotipos de salar y de valle (ver sección 3.3).

Por lo tanto, se ha acumulado una cantidad considerable de pruebas que demuestran que hay una gran variabilidad genética en la tolerancia a la

salinidad de la quinua. Esto representa un recurso importante para la selección y mejoramiento para aún mayor tolerancia, y para cultivares adaptados a diferentes altitudes, latitudes, y una amplia gama de condiciones de suelo y clima (Christiansen *et al.* 2010; Bendevis *et al.* 2013).

3. Desentrañar los mecanismos básicos.

Se cree que las halófitas y glicófitas tienen una fisiología y anatomía similar, pero que las plantas adaptadas a la sal pueden hacer un uso más eficiente de los mismos mecanismos de tolerancia a la sal (Shabala y Mackay, 2011). Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que las halófitas muestren mecanismos de tolerancia a la sal especiales que difieren de los de las glicófitas. Con respecto a las glicófitas e incluso a otras halófitas: ¿posee la quinua formas (hasta ahora desconocidas) únicas de adaptarse, y por lo tanto crecer y completar su ciclo de vida, en condiciones de alta salinidad? En términos de investigación básica, estas son las preguntas que los científicos plantean hoy y la razón por la cual, en la última década, el número de publicaciones científicas sobre este tema en relación con la quinua se han disparado, llegando a 14 en el periodo 2010-2012. El tema ha sido revisado recientemente por Adolf y sus colaboradores (Adolf *et al.* 2013).

3.1. Características morfológicas.

3.1.1. Estructura de las Semillas.

Varios estudios han demostrado que incluso las halófitas pueden ser sensibles al estrés salino durante las etapas de germinación de la semilla y emergencia de las plántulas (Debez *et al.* 2004). Entender los mecanismos que son responsables de la tolerancia o sensibilidad relativa de la semilla, tales como si es que y dónde se acumula Na, y si afecta a la viabilidad de la semilla, son cuestiones importantes. Dado que la tolerancia a la salinidad depende en gran medida de la capacidad de la planta para preservar la homeostasis de los iones (Hasegawa *et al.* 2000), la concentración y la distribución de otros iones es también una característica importante tanto en las semillas como en tejidos adultos.

Koyro y Eisa (2008) reportaron que en el cv. peruano Hualhuas la distribución de los minerales en las semillas cosechadas de plantas cultivadas bajo diferentes tratamientos de sal, entre ellos uno muy alto (NaCl 500 mM) fue alterada, pero, a fin de cuentas, altamente regulada. Estos cambios no causaron daños evidentes a la semilla ni tampoco afectaron su viabilidad. Los autores plantearon la cuestión de si la estructura y compartimentación de la semilla podría tener una influencia en la viabilidad de las semillas en condiciones de alta salinidad, sobre todo porque las semillas de quinua son del tipo “*campylotropous*”, es decir, el embrión es periférico alrededor del perispermo (tejido de almacenamiento) y por lo tanto ocupa una posición más bien externa. Aunque si el peso de la semilla disminuyó en altas concentraciones de NaCl, la reducción de materia seca fue compensada por un aumento en contenido de cenizas. El aumento en contenido de cenizas inducido por sal fue debido al aumento de la concentración de Na, pero también por un aumento en las concentraciones de K, Mg y Ca. Si bien el incremento en Na fue muy alto, la relación K/Na nunca cayó por debajo de 1. Por lo tanto, hubo una acumulación estable de K y otros nutrientes esenciales (tales como P y S), incluso a alta salinidad. De hecho, la cubierta de la semilla limita el paso de Na y Cl posiblemente tóxicos al interior de la semilla (se encontró > 90% de Na y Cl en el pericarpio). Por lo tanto, el estudio demostró que en las semillas de plantas que crecieron en condiciones salinas un mecanismo de tolerancia importante estuvo basado en la integridad de la cubierta de la

semilla y perispermo como barreras protectoras que garantizan la exclusión de Na y Cl, y el mantenimiento de una alta relación K/Na en el interior de la semilla. Hariadi *et al.* (2011) sugirieron que la viabilidad de la semilla era dependiente de su capacidad de excluir Na + del embrión en desarrollo con el fin de evitar la toxicidad de iones.

3.1.2. Vesículas de Sal (tricoma o pelo modificado que contiene sales en su interior)

Una característica típica de las halófitas es la presencia de tricomas especializados conocidos como glándulas de sal o vesículas de sal. El secuestro de sal absorbida en estas estructuras parece ser una estrategia eficaz que contribuye a la resistencia a la salinidad en algunas especies tolerantes a la sal y la sequía (Agarie *et al.* 2007; Ben Hassine *et al.* 2009). Es de suponer que están involucrados en compartimentar los iones potencialmente tóxicos, excluyéndolos de este modo de otros tejidos de la hoja, en particular del mesófilo subyacente fotosintéticamente activo. Las vesículas de sal también pueden ser útiles para reducir la pérdida de agua y el daño al aparato fotosintético inducido por UV. En las quenopodiáceas estas glándulas de sal se conocen como células de vesículas epidérmicas (EBC por sus siglas en inglés), y en la quinua están presentes en el tallo y en las superficies superior e inferior de la hoja (Figura 2). En un genotipo chileno (BO78) no se reportó diferencias significativas en las densidades de EBC en plantas no tratadas vs plantas tratadas con sal y la excreción de iones a través de las vesículas de sal fue relativamente modesta (Orsini *et al.* 2011) lo que sugiere que en este caso puede ser que las EBC no desempeñan un papel importante en la limitación de la acumulación de iones. En la halófito *Mesembryanthemum crystallinum* se mostró que las EBC acumulan agua y metabolitos, tales como cristales de betalaina, malato, flavonoides, cisteína, pinitol, inositol y oxalato de calcio (Agarie *et al.* 2007; Jou *et al.* 2007). Por lo tanto, el papel protector del EBC puede derivar de la acumulación de compuestos orgánicos con capacidad chaperona o de barrido (detoxificación) de los ROS (en inglés: Reactive Oxygen Species; Especies Reactivas de Oxígeno). Son necesarios más estudios para determinar la composición, la importancia y la función de la EBC en la quinua, también en relación con las variaciones genotipo-específicas en la tolerancia a la salinidad.



Figura 2: Glándulas de sal en la superficie de la hoja de quinua.

3.1.3. Los Estomas.

Las condiciones salinas por lo general disminuyen la tasa de transpiración, pero también la captación de CO_2 , y por lo tanto la fotosíntesis (Iyengar y Reddy 1996), a través de la disminución de la conductancia estomática (véase el apartado 3.2.1). Se supone que la reducción observada en la conductancia de los estomas en las hojas de halófitas es importante para una mejor eficiencia en el uso del agua (EUA). Esto puede originarse en las respuestas fisiológicas de adaptación a la salinidad (por ejemplo, control de apertura de los estomas) y morfológicas (por ejemplo, la densidad y el tamaño de los estomas). En el primer caso, la regulación reversible y rápida de la apertura y cierre de los poros de los estomas se consigue a través de la entrada y salida de iones en las células de guarda, un proceso que está bajo el control de la hormona vegetal ácido abscísico (ABA). Un aumento temprano en ABA, y la disminución del potencial hídrico del suelo y la hoja, son indicativos de estrés osmótico causado por la salinidad.

Se ha demostrado que el intercambio de gases y la transpiración disminuyen en la quinua bajo condiciones de salinidad (Bosque Sánchez *et al.* 2003). Al ser expuesta a diferentes niveles de salinidad y al efecto combinado del estrés salino y sequía, la quinua tuvo un aumento en la concentración de ABA en el tallo y la raíz

de acuerdo con su rol como señal en el cierre estomático y regular la conductancia estomática (Razzaghi *et al.* (2011a).

Estudios recientes han puesto de manifiesto que un mecanismo morfológico de la quinua para controlar la transpiración y, por tanto, el uso eficiente del agua (WUE en inglés) en condiciones salinas es a través de una reducción en el tamaño o densidad de los estomas, o ambos (Orsini *et al.* 2011; Shabala *et al.* 2012, Adolf *et al.* 2013). En el genotipo chileno relativamente sensible a la sal BO78 se reportó una reducción de la densidad de hasta el 50% en condiciones altamente salinas, acompañado de una reducción de la longitud estomática (Orsini *et al.* 2011). En un estudio comparativo entre 14 variedades de quinua que difieren en la tolerancia a la salinidad, Shabala *et al.* (2013) y Adolf *et al.* (2012) demostraron que, mientras todos habían reducido la densidad de estomas en condiciones salinas, este parámetro morfológico fue diversamente afectado en los diferentes genotipos.

3.2. Parámetros fisiológicos y metabólicos.

3.2.1. Intercambio de gases, conductancia estomática y tasa fotosintética.

Razzaghi *et al.* (2011a) encontraron que un aumento en la salinidad producía una reducción del potencial hídrico del suelo, y, por lo tanto,

el potencial hídrico foliar y la conductancia estomática en las plantas de quinua (cv. Titicaca) tanto en 100% de riego como en las sometidas a tratamientos de sequía progresiva. Del mismo modo, Orsini *et al.* (2011) reportaron una reducción del 50-60% en el intercambio de gases y de la conductancia en las hojas para la accesión chilena BO78 ya en niveles moderados de salinidad (150-300 mM NaCl). Una disminución de la conductancia estomática reduce la pérdida de agua (tasa de transpiración), pero también la entrada de CO_2 . Se analizó la conductancia estomática y la asimilación fotosintética de CO_2 en dos variedades contrastantes de quinua (Utusaya y Titicaca) bajo condiciones de salinidad. Utusaya, procedente de la región de los salares en Bolivia, se vio menos afectada, con una reducción de sólo el 25% de la asimilación neta de CO_2 en comparación con una reducción del 67% en Titicaca (Adolf *et al.* 2013). Sin embargo, la conductancia estomática y, por lo tanto, la tasa de fotosíntesis fueron bajas en Utusaya incluso en condiciones no salinas, una compensación típica entre la tolerancia al estrés y la productividad, un aspecto que debe ser tenido en cuenta en la selección de variedades para el cultivo en diferentes condiciones y para el fitomejoramiento. Independientemente de los efectos de la alta salinidad en la entrada de CO_2 a través de los estomas y por lo tanto su asimilación, varios informes han indicado que en las plantas de quinua cultivadas en condiciones de máxima salinidad, la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (PSII) no se vio afectada, lo que sugiere que PSII no es muy afectado por el estrés por salinidad (Hariadi *et al.* 2011, Adolf *et al.* 2013a).

3.2.2. El ajuste osmótico, la retención de K^+ , y el metabolismo de hidratos de carbono.

La alta salinidad provoca un efecto osmótico (de sequía) y puede conducir a la toxicidad de iones debido a la sobre-acumulación de Na^+ y Cl^- (Munns y Tester 2008). Para sobrevivir, las plantas deben activar los mecanismos adecuados para hacer frente a estos efectos. Las plantas se adaptan a altas concentraciones de sal externa mediante la acumulación de una variedad de moléculas orgánicas, los llamados osmolitos orgánicos, también conocidos como “solutos compatibles” (por ejemplo, prolina, glicina, betaína), o iones inorgánicos, o ambos (Flores 2004; Shabala &

Mackay 2011). Esta acumulación de osmolitos es necesaria para mantener la turgencia celular y permitir la expansión de células en condiciones de mayor osmolaridad externa. Mientras que algunas glicófitas tolerantes restringen el movimiento de iones a los brotes mediante la limitación de la entrada de iones dentro de la raíz, evitando así el riesgo de toxicidad de iones, las halófitas fácilmente absorben, translocan y acumulan los iones en las partes aéreas (Flores y Colmer 2008). Los iones acumulados (principalmente Na^+ , Cl^- , K^+) son supuestamente utilizados para el ajuste osmótico, facilitando así la absorción y el transporte de agua, y, presumiblemente, reduciendo el coste metabólico necesario para la producción de osmolitos orgánicos. Usando plantas del cv. Titicaca tratados con concentraciones de NaCl en el intervalo de 0-500 mM (ca. 0-50 dS m^{-1}), Hariadi *et al.* (2011) demostraron que el 80-95% del ajuste osmótico en hojas se consigue por medio de la acumulación de iones inorgánicos (Na^+ , K^+ y Cl^-). Una situación similar se registró para el genotipo Chileno BO78, donde también se observó un aumento de otros cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+}) (Orsini *et al.* 2011).

Wilson *et al.* (2002) investigaron la tolerancia salina y la acumulación de iones en *C. quinoa* cv. Híbrido Andino mediante el tratamiento de las plantas con una mezcla de sales (MgSO_4 , Na_2SO_4 , NaCl, y de CaCl_2) similar a la que se produciría en un suelo típico del Valle de San Joaquín en California, donde se utilizan aguas de drenaje para el riego. No encontraron ninguna reducción significativa en la altura de la planta, área foliar, peso fresco o peso seco en respuesta al aumento de los niveles de salinidad. La respuesta de la quinua a la salinidad era característica de una halófitas con un aumento del crecimiento (área foliar y peso seco), incluso a niveles de salinidad moderados. Tanto en los tallos como en las hojas, un aumento en la salinidad redujo la relación K^+/Na^+ . Una situación similar se observó en trigo (cv. Yecora Rojo) cultivado en las mismas condiciones, pero la disminución en esta relación era mucho más dramática con trigo que con quinua. En las plantas, la alta salinidad induce la salida de K^+ o una alteración en la absorción de K^+ , y la consiguiente reducción en niveles celulares de K^+ pueden ser muy perjudiciales (Demidchik *et al.* 2010). Por lo tanto, la regulación de la

homeostasis de K^+ es un aspecto importante de la tolerancia a la sal, y se cree que la capacidad de retener una óptima relación K^+/Na^+ es fundamental para la tolerancia o adaptación al estrés salino (Munns y Tester 2008). Suhayda *et al.* (1992) encontraron una fuerte relación entre la relación K^+/Na^+ de los tejidos y tolerancia a la sal en la cebada, y sugirieron que este rasgo podría ser utilizado como un criterio de selección en el proceso de obtención de variedades tolerantes a la sal. Por otra parte, un aumento en el contenido de Na^+ vacuolar debe ir acompañado de un aumento simultáneo de la osmolaridad citosólica. Esto se consigue no sólo mediante la acumulación de osmolitos orgánicos en el citosol, sino también mediante el aumento de K^+ . En la quinua (BO78) tratada con sal, las plantas expuestas a altos niveles de salinidad reportaron una concentración de K^+ tres veces más alta que en los controles o que las plantas expuestas a concentraciones de NaCl más bajas, mientras que las concentraciones de prolina no se vieron afectadas significativamente, lo que sugiere que el ion inorgánico jugó un papel más importante en el ajuste osmótico que como osmolito orgánico (Orsini *et al.* 2011).

Sin embargo, se han reportado aumentos en osmolitos orgánicos (azúcares solubles, prolina, glicilbetaína) en la quinua (Jacobsen *et al.* 2007; Ruffino *et al.* 2010). Morales *et al.* (2011) reportaron grandes cantidades de betaína, trehalosa, y especialmente trigonelina en el cv. Chipaya y cv. Ollague, y cantidades insignificantes de sorbitol, pinitol y prolina. En respuesta al estrés salino, la trigonelina se acumulaba en concentraciones muy altas tanto en hojas como en raíces (800-7000 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW dependiendo del tejido y régimen de tratamiento). Esta concentración es muy superior a la de otras especies de cultivos (soja, maíz, tomate).

El ajuste osmótico es particularmente importante durante la germinación de semillas y el establecimiento de plántulas, porque si estas fallan, ¡no habrá planta! La respuesta de las plántulas a la salinidad en términos del metabolismo de carbohidratos (aumento de la producción de azúcares solubles) parece ser un aspecto importante que permite que la quinua se ajuste osmóticamente a un ambiente salino en sus primeras etapas de desarrollo, un

importante factor de la tolerancia a la salinidad de las plantas. Prado *et al.* (2000) observaron cambios en el contenido de glucosa, fructuosa y sacarosa entre plántulas tratadas con sal y las no tratadas con sal. Rosa *et al.* (2009) analizaron la compartimentación de sacarosa-almidón y las enzimas relacionadas en plántulas estresadas con NaCl y plántulas aclimatadas a la sal a bajas temperaturas. Reportaron mayor actividad de la sacarosa-fosfato sintasa y la invertasa ácida soluble en las plantas estresadas con NaCl, y un incremento en los azúcares solubles y prolina, los cuales son esenciales para el mantenimiento del equilibrio osmótico en condiciones salinas.

Una reducción en el potencial mátrico en el interior de la semilla también puede contrarrestar la pérdida de agua bajo condiciones de alta osmolaridad externa. Koyro y Eisa (2008) sugirieron que el aumento de los niveles de proteína en las semillas cosechadas de plantas de quinua tratadas con sal tratada puede haber contribuido a la reducción de este potencial. También argumentaron que la aceleración de la germinación de estas semillas podría ser el resultado de una mayor absorción de agua a través de la acumulación de Na^+ y Cl^- en el pericarpio de semillas y de solutos orgánicos en el interior de la semilla.

3.2.3. Moléculas osmoprotectivas y otras moléculas protectoras.

La acumulación de dehidrinas fue reportada por primera vez en las semillas de algodón durante las últimas etapas de desarrollo del embrión (Rorat 2006). Además, se han encontrado dehidrinas en casi todos los tejidos vegetativos bajo condiciones de estrés, como la sequía, el frío y la alta salinidad (Battaglia *et al.* 2008; Rorat 2006). Se ha demostrado que la expresión ectópica de una dehidrina de trigo mejora la tolerancia a la alta salinidad y la deshidratación en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, y la mutación de un gen de dehidrina en el musgo *Physcomitrella patens* causa un grave deterioro en la capacidad de la planta para reanudar el crecimiento después del estrés salino y el estrés osmótico, proporcionando apoyo para el rol de las dehidrinas en los mecanismos de tolerancia al estrés. Se detectaron varias bandas de dehidrina en embriones maduros de dos cultivares de quinua adaptadas a dos ambientes contrastantes (altitud elevada vs el nivel del mar),

con algunas de las bandas mostrando diferencias cuantitativas en los dos cultivares (Carjuzáa *et al.* (2008). Más recientemente, Burrieza *et al.* (2012) estudiaron el efecto de la sal en la composición de dehidrinas de embriones maduros de cv. Hualhuas, que está adaptada a las condiciones áridas y saladas típicas del altiplano. Un análisis

Western Blot detectó al menos cuatro dehidrinas en semillas cosechadas de plantas de control y de plantas estresadas con NaCl; no se detectaron bandas adicionales en condiciones de salinidad, y sólo una banda (dehidrina 30-kDa) aumentó con el tratamiento de NaCl (Figura 3).

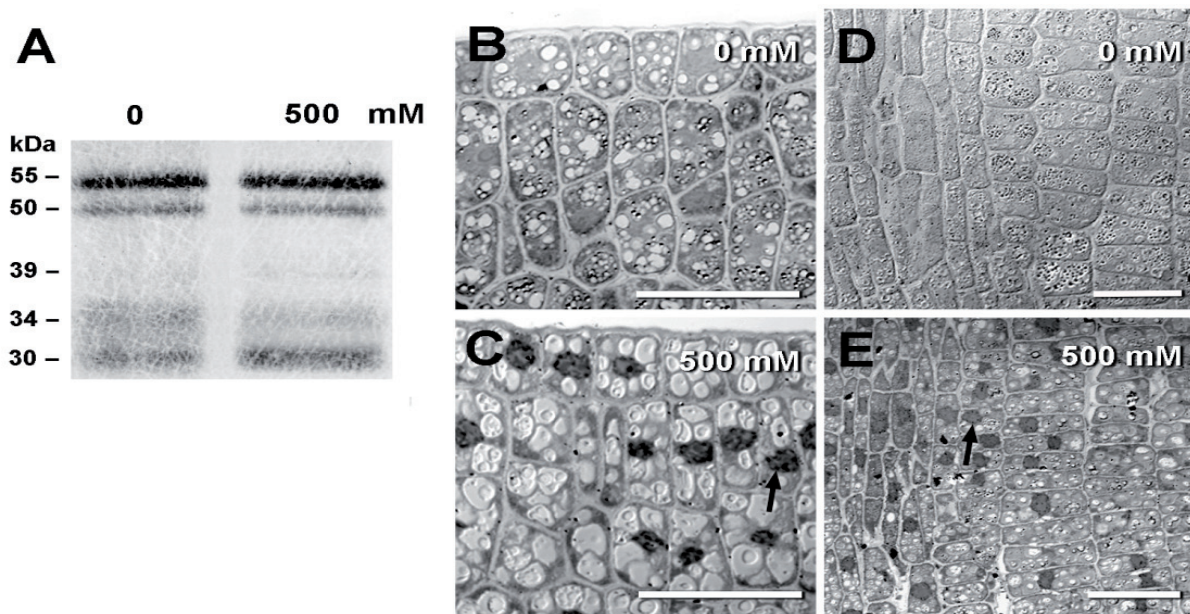


Figura 3: A. Western blot de dehidrinas en embriones maduros de quinua. Las semillas se obtuvieron a partir de plantas cultivadas en 0 y 500 mM NaCl. B-E. Inmunolocalización *in situ* de dehidrina en los cotiledones (B, C) y eje embrionario (D, E) observada con microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC). La marca (flechas) se observó principalmente en los núcleos, específicamente en la cromatina. B, D: plantas de control, C, E: plantas estresadas con sal. Barra = 20 µm. En Burrieza *et al.*, 2012. © Springer

Como se dijo anteriormente, el estrés por salinidad provoca una reducción en la disponibilidad de agua (es decir, la sequía y estrés osmótico) que conduce al cierre de los estomas y reducción en la densidad de los estomas, y la acumulación de iones tóxicos de Na⁺. Tanto el cierre de estomas y la acumulación de Na⁺ afectan la actividad fotosintética, que puede resultar en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Las ROS son potencialmente capaces de causar la peroxidación de los lípidos en las membranas celulares, daño al ADN, la desnaturalización de las proteínas, la oxidación de carbohidratos, la descomposición de pigmentos y un deterioro de la actividad enzimática (Noctor y Foyer 1998). Por lo tanto, el estrés oxidativo es un tercer componente de estrés salino, y la tolerancia está fuertemente ligada a la capacidad de la planta para controlar la

acumulación de ROS bajo condiciones de estrés. Aunque se considera que la acumulación de osmolitos orgánicos contribuye al ajuste osmótico de la planta en un ambiente salino, ahora se sabe que tales compuestos también juegan un papel importante en la tolerancia al estrés oxidativo. Se conocen cuatro clases principales de osmolitos orgánicos (aminoácidos, azúcares, polioles y aminos cuaternarias); algunos de ellos pueden actuar como chaperones moleculares protegiendo al PSII contra el estrés oxidativo, mientras que otros directamente limpian ROS (Shabala *et al.* 2012). Todas estas clases de osmolitos parecen estar presentes en los tejidos de quinua (Aguilar *et al.* 2003, Ruffino *et al.* 2010, Orsini *et al.* 2011, Ruiz Carrasco *et al.* 2011). En apoyo de esta hipótesis, se ha mostrado que la aplicación exógena de glicilbetaína mitiga sustancialmente los efectos perjudiciales del estrés oxidativo inducido

por UV en la eficiencia fotosintética (Shabala *et al.* 2012).

La acumulación de prolina durante el estrés por salinidad se ha investigado a fondo, y se ha establecido el papel de este aminoácido como osmoprotector en la protección de estructuras subcelulares y macromoléculas y como molécula de señal (Szabados y Saviouré 2010). En la accesión BO78 Orsini *et al.* (2011) informaron que las concentraciones de prolina en las hojas y tallo aumentaron significativamente bajo condiciones de salinidad; en las más altas concentraciones de NaCl (600 y 750 mM), el aumento fue *ca.* diez veces relativa a 0 mM de NaCl. En otro estudio, la salinidad moderada (300 mM NaCl) indujo una acumulación de prolina en plántulas de 15 días de edad de cuatro accesiones chilenas (BO78 y otros); estas se pueden distinguir entre las que exhibieron un aumento moderado, y las que acumularon 3 a 5 veces más prolina que los niveles de control (Ruiz-Carrasco *et al.* 2011). En el mismo estudio, estos autores analizaron los cambios en los niveles de poliaminas (PA) en los diferentes genotipos tratados con sal. Las PAs, de las cuales la putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) son las más comunes en las plantas superiores, son policationes alifáticas considerados como reguladores del crecimiento vegetal, también involucrados en las respuestas al estrés (Alcazar *et al.* 2010). Hay evidencia que apoya la idea de que las PAs ejercen una función protectora durante el estrés (eliminación de ROS, estabilización de la membrana, endurecimiento de la pared celular), y también parecen tener una función como reguladores de los canales iónicos (Kusano *et al.* 2008). Una relación inversa entre los niveles de Put y Na^+ o K^+ en tejidos de plantas están de acuerdo con la supuesta función de esta PA (Put) en el mantenimiento del balance de aniones y cationes, mientras que algunos informes apuntan a la función protectora de Spd y Spm en conferir tolerancia a la sal. Los resultados mostraron que la relación $(\text{Spd}+\text{Spm})/\text{Put}$ fue significativamente menor en BO78 que en los otros genotipos analizados, confirmando la mayor sensibilidad de este genotipo del sur de acuerdo con otros parámetros y con su procedencia desde un ambiente menos propenso al estrés. Así, mientras que la acumulación más alta de prolina distingue la accesión más tolerante, la respuesta de menor acumulación de PA distingue a

la más sensible (Ruiz-Carrasco *et al.* 2011).

3.2.4. Carga y translocación de sodio.

En su experimento con una solución de mezcla de varias sales, Wilson *et al.* (2002) demostraron que en la quinua los niveles de Na^+ aumentaron sólo 3 a 4 veces en tejidos aéreos mientras que en una variedad de trigo moderadamente tolerante el aumento fue de más de 6 veces. Recientemente Shabala *et al.* (2013) reportaron que las diferencias genotípicas en la tolerancia a la salinidad se asociaron a diferencias en absorción de Na^+ , con los cultivares más tolerantes mostrando menor contenido de Na^+ en el xilema. Los 14 genotipos ensayados podrían ser separados en dos grupos, incluidores de Na^+ y excluidores de Na^+ , con las variedades más tolerantes perteneciendo al último grupo. Parece, entonces, que también en la quinua, a pesar de que se requiere una rápida absorción y acumulación de Na^+ en las hojas para el ajuste osmótico, se evita la toxicidad de iones en los genotipos más tolerantes al limitar en cierta medida la carga de Na^+ en la savia del xilema (mecanismo de exclusión). De hecho, la exclusión de Na^+ se ha considerado siempre como un rasgo beneficioso en glicófitas (Munns y Tester 2008). En *Arabidopsis*, esta exclusión está mediada por un intercambiador de Na^+ / H^+ situado en la membrana plasmática de las células epidérmicas de la raíz (Blumwald *et al.* 2000) codificada por el Gen *Salt Overly Sensitive1* (*SOS1*) (Qiu *et al.* 2002). La expresión del gen *SOS1* en la quinua en condiciones de salinidad ha sido investigado por varios grupos (Maughan *et al.* 2009; Morales *et al.* 2011, Ruiz-Carrasco *et al.* 2011, véase más adelante).

3.3. Estudios de expresión génica.

Tal como se describe en los párrafos anteriores, la capacidad de absorción y translocación de iones de la quinua en condiciones salinas ha sido investigada por la medición de Na, K, y otros iones en la savia de la hoja. El tema también ha sido estudiado mediante técnicas de biología molecular, basadas en el hecho de que los genes centrales relacionados con el transporte de Na^+ han sido clonados en varias especies, y sus roles en la tolerancia a la salinidad han sido evaluados (Shi *et al.* 2012). En *Arabidopsis thaliana*, *NHX1*, el gen que codifica un antiportador de Na^+ / H^+ vacuolar localizado en el tonoplasto es considerado como

responsable de la compartimentación de Na^+ (y posiblemente la homeostasis de K^+) en la vacuola. La compartimentación de Na^+ en vacuolas es un mecanismo fundamental para evitar los efectos tóxicos de este ion en el citosol mientras que proporciona una presión osmótica adicional para la absorción de agua y el mantenimiento de la turgencia. El gen *SOS1* de la membrana plasmática también controla la homeostasis de iones en el citoplasma bajo condiciones de estrés salino. Debido a la extraordinaria tolerancia de la quinua a la sal, la pregunta de cómo están regulados los genes asociados con antiportadores de Na^+ es una cuestión interesante de estudiar en esta especie, como se ha hecho en otra especie resistente a la sal la hierba perenne *Lagopoides aeluropus* (Ahmed *et al.* 2013). Maughan *et al.* (2009) clonaron y caracterizaron dos genes homólogos a *SOS1* en la quinua y encontraron un alto nivel de similitud entre estas secuencias de genes y homólogos de *SOS1* en otras especies. Un análisis de expresión génica de *CqSOS1A* y *CqSOS1B* en un cultivar procedente de los salares del altiplano boliviano mostró una expresión más fuerte en las raíces en comparación con las hojas en ausencia de salinidad; sin embargo, el tratamiento salino provocó una regulación de ambos genes en las hojas pero no en las raíces, una observación que sugiere que la exclusión de Na^+ al nivel de la raíz no fue inducida por este tratamiento (Maughan *et al.* 2009). Un análisis de la expresión génica de *CqSOS1* y *CqNHX1* en cuatro genotipos chilenos que difieren en tolerancia a la salinidad confirmó que el nivel de expresión de estos genes antiportadores de sodio fue diferente en brotes y raíces, y que estos genes son regulados diferencialmente en diferentes genotipos (Ruiz-Carrasco *et al.* 2011, Figura 4). También se midieron cambios transcripcionales en *CqSOS1* y *CqNHX1* en condiciones de salinidad (450 mM NaCl) y durante la recuperación del tratamiento con sal en dos genotipos del ecotipo *salar* y dos del ecotipo valle (CICA-17 de Perú y KU-2 de Chile) por Morales *et al.* (2008). Se reportaron diferencias en los niveles de expresión génica entre las accesiones en las raíces, pero no se observaron en las hojas. La expresión de *SOS1* aumentó más fuertemente en las raíces estresadas con NaCl de los ecotipos *salar*, lo que sugiere que el Na^+ citoplasmático estaba saliendo de las raíces. Se observó un aumento en la expresión del gen que codifica una enzima implicada en la

biosíntesis del soluto compatible glicilbetaína, es decir, betaína aldehído deshidrogenasa (*BADH*), en las raíces de ambos cultivares del ecotipo *salar* (Chipaya y Ollague) y del ecotipo valle (CICA-17), sin diferencias notables entre los genotipos.

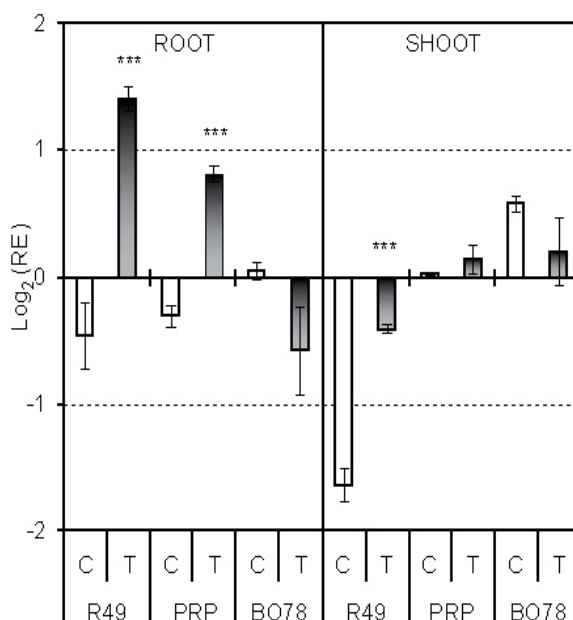


Figura. 4. Expresión de *CqNHX1* en las raíces (izquierda) y brotes (derecha) de plantas control (C) y plantas tratadas con 300 mM NaCl (T) de quinua del norte (R49), centro (PRP) y sur (BO78) de Chile. El tratamiento de sal se aplicó 60 días después de la germinación en macetas, y se tomaron muestras de las hojas 24 horas después del tratamiento con sal. Los resultados indican un aumento diferencial en la expresión de *CqNHX1* en una manera órgano-y genotipo-dependiente. Bajo estrés salino, los genotipos del norte y centro (R49 y PRP, respectivamente) acumulan transcritos de *CqNHX1* en las raíces, mientras que BO78 acumula más transcritos en los brotes (K. Ruiz Carrasco, datos no publicados).

3.4. Interacción de la salinidad con otros factores ambientales (temperatura, sequía).

Las plantas son capaces de mostrar lo que se conoce como “tolerancia cruzada”, lo que significa que si una planta es tolerante a un tipo de estrés también puede tolerar otros (Hamed *et al.* 2013). Este es un aspecto importante a considerar cuando se selecciona para una nueva variedad, ya que,

en muchas regiones del mundo, particularmente las zonas áridas y semiáridas, el calor, la sequía y la salinidad ocurren simultáneamente.

González y Prado (1992) mostraron que a temperaturas más altas el efecto perjudicial de la salinidad en la quinua fue generalmente menos grave, y que la capacidad de recuperación de las semillas tratadas con sal después de ser transferidas a condiciones no salinas era también dependiente de la temperatura. Esto fue confirmado por Chilo *et al.* (2009), quienes informaron que la disminución de la temperatura y el aumento de salinidad retrasa y reduce la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas. Rosa *et al.* (2009) también demostraron que el crecimiento de las plántulas de quinua se vió negativamente afectado por las bajas temperaturas (5 °C), y que las plántulas tratadas con sal y plántulas cultivadas a baja temperatura sin sal añadida mostraron la misma inhibición del crecimiento en relación con los controles no estresados. También mostraron que las bajas temperaturas inducen efectos diferentes en la compartimentación de sacarosa-almidón en los cotiledones de plántulas estresadas con sal. Estos resultados preliminares indican que se necesitan más investigaciones para evaluar el efecto combinado de la temperatura y la salinidad tanto en las etapas iniciales (germinación, establecimiento de plántulas) como en las etapas posteriores del crecimiento de la quinua. Adolf *et al.* (2014) demostraron en el cultivar boliviano Achachino que temperaturas cálidas prolongaron el periodo de floración, pero acortaron el tiempo de llenado de semilla en comparación con plantas cultivadas en condiciones más frescas. El resultado fue más semillas de menor tamaño y peso en el clima cálido. El rendimiento de semillas no fue diferente entre las plantas tratadas con sal cultivadas bajo los dos regímenes de temperatura (caliente y frío).

Pocos estudios han sido realizados con respecto a los efectos combinados de la sequía y el estrés salino sobre la quinua en condiciones de campo controladas. Razzaghi *et al.* (2011b) realizaron un experimento de este tipo, y se evaluó el efecto de la salinidad y el secado del suelo en

la eficiencia en el uso de la radiación (RUE¹), el rendimiento y la productividad en cv. Titicaca. Las plantas fueron expuestas a cinco niveles de salinidad (rango 0 a 40 dS/m) desde la iniciación floral en adelante, durante la fase de llenado de la semilla. Los tratamientos de salinidad fueron divididos en dos niveles de riego, riego completo (95% de capacidad de campo) y sin riego de sequía progresiva. Los resultados mostraron que no hubo interacción significativa entre la sequía y la salinidad sobre RUE, rendimiento de semillas, índice de cosecha y la productividad del agua (es decir, la semilla o materia seca total por unidad de agua utilizada). Otra prueba de campo se llevó a cabo en el sur de Italia con el mismo cultivar de quinua (Cocozza *et al.* 2012). Los resultados mostraron que, dado que el rendimiento de la semilla no fue comprometido, el cultivar Titicaca puede ser cultivado en condiciones de estrés salino y de sequía propias de los agroecosistemas de tipo mediterráneo (para más detalles véase el capítulo 5.15 de este libro).

4. ¿La alta salinidad afecta las propiedades nutricionales de la quinua?

Hay poca información sobre el rendimiento y calidad, y en particular, las propiedades nutricionales de semillas de quinua cultivadas en condiciones de alta salinidad. El cultivar peruano Hualhuas (Koyro y Eisa 2008) y el cultivar, obtenido en Dinamarca, Titicaca (Hariadi *et al.* 2011; Jacobsen *et al.* 2010) han podido completar su ciclo de vida y producir semillas, incluso a 500 mM NaCl (~50 dS/m). Sin embargo, el rendimiento, número y tamaño de las semillas, y la relación C/N fueron más bajos a altos niveles de salinidad (> 300 mM) que en condiciones de control. La baja relación C/N era principalmente el resultado de un aumento en el contenido de proteína acompañado por una disminución en hidratos de carbono totales. En un ensayo de campo llevado a cabo en el sur de Italia (véase el capítulo 6.13) la calidad de la semilla (proteínas, lípidos, hidratos de carbono) no fue significativamente alterada por el riego con agua salina, pero el contenido de fibra fue mayor en condiciones salinas, probablemente debido a una

¹ Se calculó la RUE (g MS MJ) para diferentes fracciones de rendimiento obtenidas en la cosecha final, tales como semilla (RUEsemilla), paja (RUEpaja) y materia seca total (RUEMS) como RUE = Rendimiento/IPAR.

cantidad relativa diferente de cáscara vs el resto de la semilla (Pulvento *et al.* 2012). Las semillas de diez cultivares de quinua, nueve del altiplano andino (Patacamaya sitio en Bolivia/Argentina, 3960 m snm) y uno del noroeste argentino (Encalilla sitio, 2780 m snm) fueron analizados en el rendimiento de semillas, contenido de proteína y la composición de aminoácidos cuando se cultivan bajo condiciones de sequía en dos sitios agroecológicas diferentes que tienen diferentes características del suelo, en particular, una CE de 2 dS m⁻¹ en Encalilla y de 7 dS m⁻¹ en Patacamaya. Los resultados revelaron que la composición de proteínas de las semillas dependía principalmente del genotipo, pero también depende de factores ambientales y sus interacciones, y que el perfil de aminoácidos esenciales fue más afectado que el rendimiento del grano y el contenido de proteína total (González *et al.* 2011). La composición mineral y contenido de proteína de las semillas cosechadas de plantas cultivadas bajo condiciones de suelo neutras (L1) y salinosódicos (L2) en el centro de Grecia fue evaluado en ocho variedades de quinua provenientes de bancos de semillas de Dinamarca, Chile, Brasil, Inglaterra y Holanda por Karyotis *et al.* (2008). La concentración de proteína fue significativamente diferente entre las variedades en L1 pero no en L2, y fue en promedio 20% más alto en L2 que en L1, lo que indica una correlación negativa entre la proteína del grano y el rendimiento del grano. El contenido de fósforo y hierro de las semillas en L2 no fue significativamente diferente de lo observado en L1, mientras que el contenido de la mayor parte de los otros minerales analizados (Ca, K, Mg, Zn y Mn) fue, en promedio, significativamente mayor en L1, lo que indica que las propiedades de los suelos marginales de L2 limitan la acumulación de estos elementos. Las variedades de América del Sur (Chile y Brasil) se adaptaron bien a las condiciones del suelo de ambas localidades y fueron superiores en la acumulación de elementos minerales en las semillas.

Las vitaminas y otras moléculas que ejercen propiedades antioxidantes, tales como compuestos fenólicos, que pueden eliminar radicales dañinos y reducir la peroxidación de lípidos de membrana, contribuyen a la calidad

nutricional y nutracéutica de la quinua. Gómez-Caravaca *et al.* 2012 examinaron el efecto del régimen de riego y la salinidad sobre el contenido de compuestos fenólicos de las semillas de un cultivar de Dinamarca. Encontraron sólo cambios limitados en estos compuestos en condiciones de riego reducido con o sin salinidad, lo que sugiere que las condiciones desfavorables del suelo no parecen afectar el contenido de estos compuestos bioactivos importantes de la semilla. Con respecto a otra categoría importante de moléculas antioxidantes, los resultados preliminares han mostrado que el perfil de tocoferol (vitamina E) de las semillas y las hojas de cuatro genotipos chilenos cultivados en condiciones salinas (300 mM NaCl) fueron alterados, y en algunos casos mejorado, en comparación con los controles cultivados sin NaCl, y que la respuesta fue genotipo-dependiente (Antognoni y Biondi, datos no publicados).

Las saponinas tienen una amplia gama de actividades biológicas (antimicrobiana, insecticida, antifúngica, coadyuvante de vacunas entre otras) y se pueden utilizar en la industria como detergentes y agentes surfactantes. Aunque su sabor amargo representa un aspecto negativo en términos de consumo humano, la alta producción de saponina puede ser un beneficio más de la quinua como fuente alternativa y renovable de saponinas (Woldemichael y Wink 2001; Carlson *et al.* 2012). Bajo óptimo riego el contenido de saponina fue 30% más alto en condiciones de salinidad que en ausencia de salinidad (Gómez-Caravaca *et al.* 2012). En un ensayo de campo de dos años con el cv. Titicaca, Pulvento *et al.* (2012) reportaron un aumento dosis-dependiente en la concentración de saponina de la semilla con el aumento de la salinidad. A pesar de que podría ser interpretado como una respuesta al estrés, se necesitan más estudios para determinar el mecanismo que conecta la salinidad con la producción de saponina.

Aunque en la actualidad la información sobre las diferencias genotípicas y la salinidad en las propiedades nutricionales y nutracéuticas de la quinua son insuficientes para permitirnos sacar conclusiones, parece que estas propiedades, en general, no se ven afectadas negativamente, o

incluso son mejoradas (por ejemplo, contenido de proteína y fibra) bajo condiciones de estrés.

5. Conclusiones.

Dada su naturaleza halófila, evaluada y confirmada por una amplia gama de experimentos realizados en condiciones de salinidad moderada a alta, la quinua es sin duda el cultivo ideal para los suelos agrícolas cada vez más salinizadas en todo el mundo. La información acumulada en los últimos años, aquí resumida, indica que la amplia diversidad genética de la quinua se asocia con un amplio rango de tolerancia a la alta salinidad bajo múltiples condiciones agroecológicas (sequía, frío, etc). Por lo tanto, mientras que todos los genotipos de quinua poseen un alto nivel de tolerancia a la sal en comparación con todas las otras especies de cultivos, algunos genotipos son más tolerantes que otros. Esta variación representa un recurso precioso, que puede ser útilmente explotado para la selección y la obtención de cultivares adaptados a los suelos y condiciones climáticas más diversos. La quinua también representa una buena planta modelo en la que se pueden revelar los mecanismos de la base de la tolerancia a la sal, en primer lugar porque es el único cultivo halófilo que produce semillas para la alimentación humana, y segundo, porque sus mecanismos de tolerancia pueden ser diferentes de las de otras especies de este pequeño grupo de plantas adaptadas al sal. Parte de la información (morfológica, fisiológica y molecular) disponible a la fecha ya puede ayudar a los fitomejoradores en la selección de características útiles. Por último, pero no menos importante, hay una buena cantidad de evidencia que indica que las propiedades nutricionales de la quinua no se ven gravemente afectadas en condiciones de alta salinidad y que, en algunos casos, incluso se mejoran. Este aspecto corrobora la idea de que la quinua es un cultivo que puede ofrecer a las comunidades que viven en entornos difíciles opciones para mejorar sus medios de vida, generar ingresos, lograr la seguridad alimentaria, y disfrutar de una mejor nutrición y la salud.

Agradecimientos

Se agradece las contribuciones financieras del programa de intercambio de TWAS-ICGEB ("Tolerance strategies of quinoa plants under salt stress" CRP.PB/CHI06-01), el programa de la EU-IRSES (PIRSES-GA-2008- 230.862), el proyecto SWUP-MED del EU-FP7 ("Sustainable water use securing food production in dry areas of the Mediterranean region") y el proyecto Fondecyt (Ministerio de Educación, Chile), proyecto N ° 3130624 (a Ruiz KB).

Referencias

- Adolf VI, JW Gößling E. Rosenqvist, F Liu, MN Andersen, S-E Jacobsen (2014). Combined effects of salinity and temperature on quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) under simulated climates of Bolivia and Morocco. I. Development, yield and seed quality. *Functional Plant Biology* (presentado).
- Adolf VI, S-E Jacobsen y S Shabala (2013). Salt tolerance mechanisms in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Environmental and Experimental Botany* 92: 43-54.
- Adolf VI, S Shabala, MN Andersen, F Razzaghi y S-E Jacobsen (2012). Varietal differences of quinoa's tolerance to saline conditions. *Plant and Soil* 357: 117-129.
- Agarie S, T Shimoda, Shimizu, K Baumann, H Sunagawa, A Kondo, O Ueno, T Nakahara, A Nose y JC Cushman (2007). Salt tolerance, salt accumulation, and ionic homeostasis in an epidermal bladder-cell-less mutant of the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Journal of Experimental Botany* 58: 1957-1967.
- Aguilar PC, Z Cutipa, E Machaca, M Lopez y S-E Jacobsen (2003). Variation of proline content of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) in high beds (waru waru). *Food Reviews International* 19: 121-127.
- Ahmed MZ, T Shimazaki, S Gulzar, A Kikuchi, B Gul, MA Khan, H-W Koyro, B Huchzermeyer y KN Watanabe (2013). The influence of genes regulating transmembrane transport of Na⁺ on the salt resistance of *Aeluropus lagopoides*. *Functional Plant Biology* 40: 860-871.

- Alcázar R, T Altabella, F Marco, C Bortolotti, M Reymond, C Koncz, P Carrasco y Tiburcio AF (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231: 1237–1249.
- Battaglia M, Y Olvera-Carrillo, A Garciarrubio, F Campos y Covarrubias AA (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophyllins. *Plant Physiology* 148: 6–24.
- Ben Hassine A, ME Ghanem, S Bouzid y S Lutts (2009). Absciscic acid has contrasting effects on salt excretion and polyamine concentrations of an inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus*. *Annals of Botany* 104: 925–936.
- Bendevis M.A, Y Sun, S Shabala, E Rosenqvist, F Liu y S-E Jacobsen (2013). Photoperiod dependent ABA and soluble sugar responses of quinoa. *Journal of Plant Growth Regulation* (presentado).
- Blumwald E, GS Aharon y MP Apse (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1465: 140–151.
- Bosque-Sanchez H, R Lemeur, P Van Damme y S-E Jacobsen (2003). Ecophysiological analysis of drought and salinity stress of quinoa. *Food Reviews International* 19: 111–119.
- Burrieza HP, H-W Koyro, L Martínez Tosar, K Kobayashi y Maldonado S (2012). High salinity induces dehydrin accumulation in *Chenopodium quinoa* Willd. embryos. *Plant and Soil* 354: 69–79.
- Carjuzaa P, M Castellión, A J Distéfano, M del Vas y S Maldonado (2008). Detection and subcellular localization of dehydrin-like proteins in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) embryos. *Protoplasma* 233: 149–156.
- Carlson D, J A Fernandez, H D Poulsen, B Nielsen y S-E Jacobsen (2012). Effects of quinoa hull meal on piglet performance and intestinal epithelial physiology. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96: 198–205.
- Chilo G, Molina MV, Carabajal R y M Ochoa (2009). Temperature and salinity effects on germination and seedling growth on two varieties of *Chenopodium quinoa*. *AgriScientia* 26: 15–22.
- Christensen SA, DB Pratt, C Pratt, MR Stevens, EN Jellen, CE Coleman, DJ Fairbanks, A Bonifacio y PJ Maughan (2007). Assessment of genetic diversity in the USDA and CIP-FAO international nursery collections of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using microsatellite markers. *Plant Genetic Resources* 5: 82–95.
- Christiansen JL, S-E Jacobsen & ST Jørgensen (2010). Photoperiodic effect on flowering and seed development in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Acta Agriculturae Scandinavica, Sección B: Plant Soil Science* 60 : 539–544.
- Cocoza C, C Pulvento, A Lavini, M Riccardi, R d'Andria y R Tognetti (2012). Effects of increasing salinity stress and decreasing water availability on ecophysiological traits of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Agronomy and Crop Science* doi:10.1111/jac.12012.
- Debez A, K Ben Hamed, C Grignon y C Abdelly (2004). Salinity effects on germination, growth, and seed production of the halophyte *Cacile maritima*. *Plant Soil* 262:179–189.
- Delatorre-Herrera J y M Pinto (2009). Importance of ionic and osmotic components of salt stress on the germination of four quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) selections. *Chilean Journal of Agricultural Research* 69: 477–485.
- Demidchik V, TA Cuin, D Svistunenko, Smith SJ, Miller AJ, Shabala S, Sokolik A & Yurin V (2010). Arabidopsis root K⁺-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science* 123: 1468–1479.
- Flowers TJ (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 55: 307–319.
- Flowers TJ y TD Colmer (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* 179: 945–963.
- Fuentes FF y A Bhargava (2011). Morphological analysis of quinoa germplasm grown under lowland desert conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science* 7: 124–827.
- Fuentes FF, D Bazile, A Bhargava y EA Martinez (2012). Implications of farmers' seed exchanges for on-farm conservation of quinoa, as revealed by its genetic diversity in Chile. *Journal of Agricultural Science* 150: 702–716.
- Fuentes FF, EA Martínez, PV Hinrichsen, EN

- Jellen y PJ Maughan (2009). Assessment of genetic diversity patterns in Chilean quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) germplasm using multiplex fluorescent microsatellite markers. *Conservation Genetics* 10: 369–377.
- García M, Raes D, Jacobsen S-E (2003). Evapotranspiration analysis and irrigation requirements of quinoa (*Chenopodium quinoa*) in the Bolivian highlands. *Agricultural Water Management* 60:119–134.
- Geerts S, Raes D, Garcia M, Del Castillo C, Buytaert W (2006). Agro-climatic suitability mapping for crop production in the Bolivian Altiplano: A case study for quinoa. *Agricultural and Forest Meteorology* 139:399–412.
- Gómez-Caravaca A, G lafelice, A Lavini, C Pulvento, M Caboni, y E Marconi (2012). Phenolic compounds and saponins in quinoa samples (*Chenopodium quinoa* Willd.) grown under different saline and nonsaline irrigation regimes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 4620-4627.
- Gómez-Pando LR, R Álvarez-Castro y E de la Barra (2010). Effect of salt stress on Peruvian germplasm of *Chenopodium quinoa* Willd.: a promising crop. *Journal of Agronomy and Crop Science* 196: 391-396.
- Gonzalez JA, Y Konishi, M Bruno, M Valoy & FE Prado (2011). Interrelationships among seed yield, total protein and amino acid composition of ten quinoa (*Chenopodium quinoa*) cultivars from two different agroecological regions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 1222-1229.
- Hamed KB, H Ellouzi, Talbi OZ, Hessini K, Slama I, Ghnaya T, Munné Bosch S, Savouré A & Abdelly C (2013). Physiological response of halophytes to multiple stresses. *Functional Plant Biology* 40: 883-896.
- Hariadi Y, K Marandon, Y Tian, S-E Jacobsen y Shabala S (2011). Ionic and osmotic relations in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) plants grown at various salinity levels. *Journal of Experimental Botany* 62: 185-193.
- Hasegawa PM, RA Bressan, JK Zhu & HJ Bohnert (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Biology* 51: 463–499.
- Iyengar ERR y MP Reddy (1996). Photosynthesis in highly salt tolerant plants. In: Pesserkali, M. (Ed.), *Handbook of Photosynthesis*. Marshal Dekar, Baten Rose, USA, pp. 897–909.
- Jacobsen S-E, JL Christiansen y J Rasmussen (2010). Weed harrowing and inter-row hoeing in organic grown quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Outlook on Agriculture* 39: 223–227.
- Jacobsen S-E, CR Jensen y F Liu (2012). Improving crop production in the arid Mediterranean climate. *Field Crops Research* 128: 34–47.
- Jacobsen S-E, F Liu y CR Jensen (2009). Does root-sourced ABA play a role for regulation of stomata under drought in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Scientia Horticulturae* 122: 281–287.
- Jacobsen S-E, C Monteros, JL Christiansen, LA Bravo, LJ Corcuera y A Mujica (2005). Plant responses of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to frost at various phenological stages. *European Journal of Agronomy* 22: 131–139.
- Jacobsen S-E, C Monteros, LJ Corcuera, LA Bravo, JL Christiansen y A Mujica (2007). Frost resistance mechanisms in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *European Journal of Agronomy* 26: 471–475.
- Jacobsen S-E, A Mujica & CR Jensen (2003). The resistance of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to adverse abiotic factors. *Food Reviews International* 19: 99-109.
- Jou Y, YL Wang y HCE Yen (2007). Vacuolar acidity, protein profile, and crystal composition of epidermal bladder cells of the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Functional Plant Biology* 34: 353–359.
- Karyotis Th, C Iliadis, Ch Noulas y Th Mitsibonas (2003). Preliminary research on seed production and nutrient content for certain quinoa varieties in a saline-sodic soil. *Journal of Agronomy and Crop Science* 189: 402-408.
- Koyro H-W y SS Eisa (2008). Effect of salinity on composition, viability and germination of seeds of *Chenopodium quinoa* Willd. *Plant Soil* 302: 79-90.

- Kusano T, T Berberich, C Tateda y Y Takahashi (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228: 367-381.
- Maughan PJ, TB Turner, CE Coleman, DB Elzinga, EN Jellen, JA Morales, JA Udall, DJ Fairbanks y A Bonifacio (2009). Characterization of *Salt Overly Sensitive 1 (SOS1)* gene homoeologs in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Genome* 52: 647-657.
- Morales AJ, P Bajgain, Z Garver, PJ. Maughan y JA. Udall (2011). Physiological responses of *Chenopodium quinoa* to salt stress. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 3: 219-232.
- Munns R y M Tester (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Noctor G y CH Foyer (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.
- Orsini F, M Accorsi, G Gianquinto, G Dinelli, F Antognoni, KB Ruiz-Carrasco, EA Martínez, M Alnayef, I Marotti, S Bosi y S Biondi (2011). Beyond the ionic and osmotic response to salinity in *Chenopodium quinoa*: functional elements of successful halophytism. *Functional Plant Biology* 38: 1-14.
- Prado FE, C Boero, M Gallardo y JA González (2000). Effect of NaCl on germination, growth, and soluble sugar content in *Chenopodium quinoa* Willd. seeds. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 41: 27-34.
- Pulvento C, M Riccardi, A Lavini, R d'Andria, G lafelice y E Marconi (2010). Field trial evaluation of two *Chenopodium quinoa*'s genotypes grown in rainfed conditions in a Mediterranean environment of south Italy. *Journal of Agronomy and Crop Science* 197: 407-411.
- Pulvento C, M Riccardi, A Lavini, G lafelice, E Marconi y R d'Andria (2012). Yield and quality characteristics of *Chenopodium quinoa* Willd. grown in open field under different saline and not saline irrigation. *Journal of Agronomy and Crop Science* 198: 254-263.
- Qiu Q-S, Y Guo, MA Dietrich, KS Schumaker y J-K Zhu (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.* 99: 8436-8441.
- Razzaghi F, SH Ahmadi, VI Adolf, CR Jensen, S-E Jacobsen & MN Andersen (2011a) Water relations and transpiration of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) under salinity and soil drying. *Journal of Agronomy and Crop Science* 197: 348-360.
- Razzaghi F, SH Ahmadi, S-E Jacobsen, CR Jensen y MN Andersen (2011b) Effects of salinity and soil-drying on radiation use efficiency, water productivity and yield of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Agronomy and Crop Science* 198: 173-184.
- Rorat T (2006). Plant dehydrins tissue location, structure and function. *Cellular & Molecular Biology Letters* 11: 536-556.
- Rosa M, M Hilal, JA González y FE Prado (2009). Low-temperature effect on enzyme activities involved in sucrose-starch partitioning in salt-stressed and salt-acclimated cotyledons of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 300-307.
- Ruffino AMC, M Rosa, M Hilal, JA González y FE Prado (2010). The role of cotyledon metabolism in the establishment of quinoa (*Chenopodium quinoa*) seedlings growing under salinity. *Plant Soil* 326: 213-224.
- Ruiz-Carrasco KB, F Antognoni, AK Coulibaly, A Morales, S Lizardi, A Covarrubias, EA Martínez, MA Molina-Montenegro, S Biondi y A Zurita-Silva (2011). Variation in salinity tolerance of four lowland genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as assessed by growth, physiological traits, and sodium transporter gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 1333-1341.
- Schabes FI y EE Sigstad (2005). Calorimetric studies of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seed germination under saline stress conditions. *Thermochimica Acta* 428: 71-75.
- Shabala L, Y Hariadi y S-E Jacobsen (2013). Genotypic difference in salinity tolerance in

quinoa is determined by differential control of xylem Na^+ loading and stomatal density *Journal of Plant Physiology* 170: 906–914.

Shabala S y A Mackay (2011). Ion transport in halophytes. *Advances in Botanical Research* 57: 151–187.

Shabala L, A Mackay, Y Tian, S-E Jacobsen, D Zhou y S Shabala (2012). Oxidative stress protection and stomatal patterning as components of salinity tolerance mechanism in quinoa. *Physiologia Plantarum* 146: 26–38.

Shi H, FJ Quintero, JM Pardo y J-K Zhu (2002). The putative plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 controls long-distance Na^+ transport in plants. *Plant Cell* 14: 465–477.

Suhayda CG, Redmann RE, Harvey BL y Cipywnyk AL (1992). Comparative response of cultivated and wild barley species to salinity stress and calcium supply. *Crop Science* 32: 154–163.

Szabados L y A Savouré (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15: 89–97.

Wilson C, JJ Read y E Abo-Kassem (2002). Effect of mixed-salt salinity on growth and ion relations of a quinoa and a wheat variety. *Journal of Plant Nutrition* 25: 2689–2704.

Woldemichael G M y M Wink (2001). Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49: 2327–2332.